

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 5 月 21 日 (21.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/040970 A1

(51) 国際特許分類: A01K 67/027, C12N 5/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014149

(22) 国際出願日: 2003 年 11 月 6 日 (06.11.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-322995 2002 年 11 月 6 日 (06.11.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人実験動物中央研究所 (CENTRAL INSTITUTE FOR EXPERIMENTAL ANIMALS) [JP/JP]; 〒216-0001 神奈川県 川崎市 宮前区 野川 1430 番地 Kanagawa (JP). 学校法人慶應義塾 (KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒108-8345 東京都 港区 三田 2 丁目 15 番 45 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 宮川 義隆 (MIYAKAWA, Yoshitaka) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都 新宿区 信濃町 35 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 木崎 昌弘 (KIZAKI, Masahiro) [JP/JP];

〒160-8582 東京都 新宿区 信濃町 35 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 池田 康夫 (IKEDA, Yasuo) [JP/JP]; 〒160-8582 東京都 新宿区 信濃町 35 番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 中村 雅登 (NAKAMURA, Masato) [JP/JP]; 〒158-0081 東京都 世田谷区 深沢 2 丁目 6 番 9 号 Tokyo (JP). 大西 保行 (OHNISHI, Yasuyuki) [JP/JP]; 〒227-0064 神奈川県 横浜市 青葉区 田奈町 25-1 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門 1 丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5 森ビル 3 階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MODEL ANIMAL OF HUMAN HEMATOPOIETIC ORGAN TUMOR

(54) 発明の名称: ヒト造血器腫瘍の動物モデル

(57) Abstract: It is intended to provide a model mouse with human hematopoietic organ tumor cells, which carries human hematopoietic organ tumor cells transplanted and surviving in its body, shows pathological conditions of human hematopoietic organ tumor and is usable in screening a remedy for human hematopoietic organ tumor, and utilization of the mouse. A method of constructing a human hematopoietic organ tumor model mouse which comprises transplanting human hematopoietic organ tumor cells into an NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) mouse.

(57) 要約: ヒト造血器腫瘍細胞を体内に生着させ、ヒト造血器腫瘍の症状を呈し、ヒト造血器腫瘍の治療薬のスクリーニングに用い得るヒト造血器腫瘍細胞モデルマウスおよびそのマウスの利用の提供。 NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) マウスにヒト造血器腫瘍細胞を移植することを含む、ヒト造血器腫瘍マウスモデルの作出法。

WO 2004/040970 A1

明細書

ヒト造血器腫瘍の動物モデル

5 技術分野

本発明は、ヒト造血器腫瘍の病態モデルマウスの作出に関する。

背景技術

10 多発性骨髄腫は、形質細胞の悪性腫瘍である。多発性骨髄腫患者の典型的な臨床症状は、貧血、骨折、高カルシウム血症、腎機能障害および繰り返す感染症であり、これらの症状は骨髄における悪性腫瘍細胞の増殖が原因である。多発性骨髄腫の余命を長くするために化学療法または自家骨髄移植が行われる。しかしながら、これらの予後はいまだ良好ではない。多発性骨髄腫の病因は、多発性骨髄腫が不均質なことからいまだ解明されていない。

15 リンパ腫はリンパ球の異常増殖を伴う造血器腫瘍である。予後の良好なホジキン病と予後不良な非ホジキンリンパ腫に分類される。新しい薬剤の開発に病態を反映する疾患動物モデルが必要とされている。

ヒト多発性骨髄腫およびヒトT細胞リンパ腫の病因解明および治療法の開発のためにヒト多発性骨髄腫およびヒトT細胞リンパ腫の病態モデルマウスが望まれていた。従来よりヒト骨髄腫細胞を移植したマウスについての報告はあった。しかし、従来の移植法は非常に複雑であった。例えば、Pilarskiらはヒト骨髄腫細胞を心腔内に移植した（非特許文献1参照）。Yaccobyらは、マウス皮下にヒト胎児長管骨を移植し、その骨片内にヒト骨髄腫細胞を移植し、局所的に生着することを報告している。一方、Tsunenariらは、ヒトKPMM2骨髄腫細胞をSCIDマウス
20 に移植して得た異種移植モデルについて報告しているが（非特許文献2参照）、KPMM2はSCIDマウス中で固形腫瘍として既に維持されており、ヒト骨髄腫の病態を正確に反映するとはいえない。このように、従来存在していた免疫不全マウスを用いても、病因の解析、治療法の開発に簡便に用いられるヒト疾患モデル動物を作出することはできなかった。

30 非特許文献1

Exp Haemat, 30, 221-228, 2002; Blood, 95, 1056-1065, 2000

非特許文献 2

Blood, 90, 2437-2444, 1997

5 発明の開示

本発明は、ヒト造血器腫瘍細胞を体内に生着させ、ヒト造血器腫瘍の症状を呈し、ヒト造血器腫瘍の治療薬のスクリーニングに用い得るヒト造血器腫瘍細胞モデルマウスおよびそのマウスの利用を提供することを目的とする。

本発明者らは、先に免疫不全マウスであるNOGマウスを開発していた（国際公開番号W002/43477号）。NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) マウスは機能的なT細胞およびB細胞を共に欠失し、マクロファージ機能が減退し、NK細胞またはNK活性を消失し、かつ樹状細胞機能が減退しており、優れた異種細胞生着性を有していることを特徴とするマウスである。NOGマウスはこのような特徴を有しているので、移植したヒト細胞が、排除されることなく効率よく生着し得る。NOGマウスはNOD/Shi-scidマウスやC.B-17-scidマウス等の先天的な免疫不全マウスよりも免疫能が低下している。本発明者等はインターロイキン6依存性で増殖速度の遅いヒト骨髓腫細胞株U266、およびT細胞リンパ腫LM-2-JCKをNOGマウスに移植することによりヒト造血器腫瘍モデルマウスの作出に成功し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) マウスにヒト造血器腫瘍細胞を移植することを含む、ヒト造血器腫瘍マウスモデルの作出法、

(2) ヒト造血器腫瘍細胞がヒト多発性骨髓腫細胞U266細胞である、(1)のヒト造血器腫瘍マウスモデルの作出法、

(3) ヒト造血器腫瘍細胞がヒトT細胞リンパ腫細胞LM-2-JCKである、(1)のヒト造血器腫瘍マウスモデルの作出法、

(4) ヒト造血器腫瘍細胞が移植され体内にヒト造血腫瘍が形成されたヒト造血器腫瘍NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) マウスモデル、

(5) ヒト造血器腫瘍がヒト多発性骨髓腫である(4)のヒト造血器腫瘍NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) マウスモデル、

(6) ヒト造血器腫瘍がヒトT細胞リンパ腫であるヒト造血器腫瘍NOD (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) マウスモデル、

(7) (4) のヒト造血器腫瘍マウスモデルに被験物質を投与することを含む、ヒト造血器腫瘍の治療薬のスクリーニング方法、

5 (8) ヒト造血器腫瘍がヒト多発性骨髄腫である (7) のスクリーニング方法、および

(9) ヒト造血器腫瘍がヒトリンパ腫である (7) のスクリーニング方法。

10 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2002-322995号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1は、LM-2-JCK細胞を移植したマウスにおける腫瘍の大きさの経時的変化を示す図である。

15 図2は、NODマウスにおけるU266細胞の浸潤部位を示す写真 (倍率5.3倍) である。

図3は、NODマウスにおけるU266細胞の浸潤部位を示す写真 (倍率12倍) である。

20 図4は、NODマウスにおけるU266細胞の浸潤部位を示す写真 (倍率100倍) である。

図5は、NODマウスにおけるU266細胞の浸潤部位を示す写真 (倍率100倍) である。

図6は、U266細胞を移植したNOD/Shi-scidマウスの骨髄を示す写真 (倍率12倍) である。

25 図7は、U266細胞を移植したNOD/Shi-scidマウスの骨髄を示す写真 (倍率100倍) である。

図8は、U266細胞を移植したC.B-17/Icr-scidマウスの骨髄を示す写真 (倍率12倍) である。

30 図9は、U266細胞を移植したC.B-17/Icr-scidマウスの骨髄を示す写真 (倍率100倍) である。

図 1 0 は、NOGマウスおよびC. B-17/Icr-scidマウスの脾臓を示す写真である。

図 1 1 は、NOGマウスを作出するための戻し交配の概略を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

5 以下、本発明を詳細に説明する。

1. NOGマウスの作出

NOGマウスの作出は、国際公開番号W002/43477号に記載の方法により以下のように行うことができる。

以下に示すAのマウスにBのマウスを戻し交配することによりNOGマウスを作出することが可能である。

A : NOD/ShiマウスにC. B-17/Icr-scid (C. B-17-scidまたはCB17/SCIDマウスとも呼ぶ) マウスを戻し交配することにより得られるマウス、

B : インターロイキン2受容体 γ 鎖遺伝子をノックアウトしたマウス。

ここで異種細胞としては、ヒトを始めとしてマウス、ラット等の哺乳動物由来の細胞や組織、特にヒトの幹細胞、リンパ球や腫瘍細胞等を挙げることができるが、これらに限定されない。

AのマウスにおけるNOD/ShiマウスへのC. B-17/Icr-scidマウスの戻し交配は、当業者に公知の手法、例えば、Cross Intercross法による戻し交配(Inbred Strains in Biomedical Research, M. F. W. Festing, 1979, ISBN 0-333-23809-5, The Macmillan Press, London and Basingstoke)に従い、C. B-17/Icr-scidマウスとNOD/Shiマウスとを交配し、そのF1マウス同士を更に交配して得たF2マウスの血清中の免疫グロブリン量を測定し、検出できないマウスを選別する。このマウスを再びNOD/Shiマウスと交配する。この操作を9回以上繰り返し(Cross Intercross法)行うことによって実施できる。

尚、NOD/ShiマウスおよびC. B-17/Icr-scidマウスは共に日本クレア株式会社から販売されている。また、これらのマウスの交配により得られるマウスとしては、例えば、本発明者らが以前に樹立したNOD-scidマウス(特開平9-94040号公報)があり、これを日本クレア株式会社から入手して直接Aのマウスとして用いることもできる。尚、NOD/ShiマウスおよびNOD-scidマウスについては、上記以外に本出願人も所持しており、必要に応じていつでも分譲することができる。

また、Bのマウスにおけるインターロイキン2受容体 γ 鎖遺伝子のノックアウトは、当業者に公知の手法、例えば、マウスES細胞を用いた相同組換えの手法(C
apecchi, M. R., Altering the genome by homologous recombination, Science,
(1989) 244, 1288-1292)に従い、マウス由来の特定の遺伝子と例えばネオマイ
5 シン等の薬剤耐性遺伝子を含む相同遺伝子とをES細胞の段階で置き換えた後、該
ES細胞を受精卵に注入することにより実施できる。

具体的には、例えば、129/SVマウスのゲノムライブラリーからヒトのIL-2R γ c
DNAをプローブとしてマウスIL-2R γ を含む遺伝子クローンを単離し、該クローン
のうちIL-2R γ 全長を含む8.6kbの大きさの断片を使用してターゲッティングベク
10 ターを作製する。すなわち、前記断片のIL2Rのエクソン7と8との間にネオマイ
シン耐性遺伝子を発現するPMC1-neoポリAを挿入し、またエクソン8から1kb離
れた3'側にジフテリア毒素-A遺伝子を配置する。次いで、前記ベクターを直鎖
状にし、E14 ES細胞 1×10^7 個に電気穿孔法で導入する。その後、G418を含む培
養液の中で相同的組換えを起こしたESクローンを選択し(PCRまたはサザン法で確
15 認)、該当ESクローンをC57BL/6マウスの胚盤胞に注入した後、仮親マウスの子宮
に移植する。この仮親マウスから生まれたキメラマウスを更にC57BL/6マウスと
交配することによって、生殖細胞系に伝達したIL2R γ KOヘテロマウスを得ること
ができる。

あるいは、既に確立されているインターロイキン2受容体 γ 鎖遺伝子ノックア
20 ウトマウス系統を直接入手して用いてもよく、こうしたマウス系統として、例え
ば、IL2R γ KOマウス系統(菅村和男教授[東北大学医学部生体防御学講座・免疫分
野]より作出されたインターロイキン2受容体 γ 鎖ノックアウトマウス(Ohbo K,
Suda T, Hashiyama Mら、Modulation of hematopoiesis in mice with a trunca
ted mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. Blood 1996;87(3):9
25 56-67))がある。尚、IL2R γ KOマウスは、作出者である菅原教授の委嘱によって、
現在は(財)実験動物中央研究所の胚保存バンクの中で保存されており、必要に応
じていつでも凍結胚または融解復元マウスとして入手することができる。

さらに、AのマウスへのBのマウスの戻し交配は、上記と同様に、当業者に公
知の手法、例えば、上述の戻し交配に従い、すなわちNOD-scidマウスとIL2R γ KO
30 マウスとを交配し、そのF1マウスをNOD-scidマウスに戻し交配することにより実

施できる。

2. 病態モデルマウスの作出

NOGマウスにヒト造血器腫瘍細胞を移植し、NOGマウスに生着させることにより、ヒト造血器腫瘍モデルマウスを作出することができる。

- 5 造血器腫瘍としては、多発性骨髄腫、リンパ腫、白血病、骨髄増殖性疾患等が挙げられ、これらの株化細胞、患者検体を用いることができる。ヒト多発性骨髄腫の株化細胞としては、U266細胞、RPMI8226、IM9が、ヒトリンパ腫の株化細胞としては、LM-2-JCK細胞、HS-Sultanなどが挙げられる。これらの細胞は、ATCC細胞バンク（米国）、JCRB細胞バンク（日本）から入手可能である。また、以下
- 10 の方法により維持増殖させ、使用することもできる。

NOGマウスは既存の免疫不全マウスには生着しなかった細胞が生着する可能性が高く、骨髄腫、リンパ腫以外にも白血病、骨髄異形成症候群、骨髄増殖性疾患、自己免疫疾患などの患者検体（リンパ節、末梢血細胞、骨髄細胞など）を移入し、疾患モデルマウス作製ができると期待される。

- 15 これらの腫瘍のモデルマウスを作出するには、腫瘍細胞株をNOGマウスに移植して生着させればよい。移植は細胞を生理食塩水等中に適当な密度で分散させ、皮下注射、静脈内注射等により行えばよく、細胞株に応じて適宜移植方法を選択することができる。

- 移植細胞数も、細胞株に応じて適宜選択できるが、マウス1匹当たり $10^6 \sim 10^7$
- 20 細胞を移植すればよい。

移植後数週間から数ヶ月で、細胞が生着し、ヒト造血器腫瘍が形成されマウスに体重減少、呼吸促迫、麻痺、立毛など諸症状が出現し、ヒト造血器腫瘍病態モデルマウスが確立される。

3. 病態モデルマウスの利用

- 25 このようにして得られたヒト腫瘍モデルマウスを用いて、抗癌剤、癌転移抑制剤等のスクリーニングを行うことができる。この方法としては、腫瘍を形成したマウスに、経口、経皮等の適当な方法で候補薬剤を投与し、腫瘍の大きさ、転移巣の数・大きさ、マウスの生死等を観察することにより薬剤の効果を判定することができる。骨髄腫U266細胞を移植したNOGマウスに抗がん剤ドキソルビシンを
- 30 投与したところ、マウス血中に検出される移入した骨髄腫細胞由来のヒト免疫グ

ロブリン量が約3割減少し、抗がん剤の効果判定に有効で、治療モデルとして応用可能であることが確認されている。

- 骨髄、脾臓へのヒト腫瘍細胞の浸潤はヒト腫瘍細胞を特異的に認識する抗体（抗CD45抗体など）を用いてフローサイトメトリー法にて定量が可能。各臓器の
- 5 病理組織標本により浸潤を合わせて確認することができる。また血中のヒト免疫グロブリンは、サンドイッチELISA法にて検出が可能である。

〔実施例1〕 NK活性を消失かつ、樹状細胞機能を減退させた免疫不全マウス（NOGマウス）の作製

- 10 NK活性を消失させた多機能免疫不全マウスを得るために、（財）実験動物中央研究所で維持しているNOD/Shi-scidマウス（日本クレアK. K. からも入手可）（8週齢）に、菅村和夫教授（東北大学医学部生体防御学講座・免疫分野）より譲渡されたインターロイキン2受容体 γ 鎖ノックアウトマウス（IL-2R γ KOマウス）（8週齢）を戻し交配することによって、IL-2R γ 変異遺伝子を導入したF1マウスを作製
- 15 した。F1マウスでの変異IL-2R γ 鎖遺伝子の導入は、該遺伝子をPCRで増幅して検出することにより確認した。具体的には、まずF1マウスの眼底より採取した血液100 μ LからDNA自動抽出機（MagExtractor、TOYOB0社製）によりDNAを抽出した。このDNA1.5 μ Lに、23.5 μ Lの1.5mM MgCl₂、0.4mM dNTPおよび25pmolの2セットのプライマー（野生型の判定には下記プライマーPIとPIIIのセット、変異型を判定
- 20 するには同PIとPIIのセットを用いた）を含むPCR緩衝液を添加し、IL-2R γ 鎖遺伝子の野生型と変異型とを判定するPCRを下記増幅条件下で行った。

（プライマー）

PI : 5'-CTGCTCAGAATGATGCCTCCAATTCC-3'（配列番号1）

PII : 5'-CCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAAT-3'（配列番号2）

- 25 PIII : 5'-GATCCAGATTGCCAAGGTGAGTAG-3'（配列番号3）

（PCR増幅条件）

94℃で5分の加熱処理後、94℃で1分、55℃で1分、72℃で1分を1サイクルとして30～35サイクル実施し、その後72℃で10分加熱した。

上記PCRで得られたPCR産物を2%アガロースゲル中で電気泳動に供し、エチジ

ウムブロミド染色後に検出される発色バンドのサイズで判定した。野生型では約660bp、変異型では約350bpのサイズのバンドが認められた。

(戻し交配)

次に、この変異IL-2R γ 遺伝子を導入したF1マウスをNOD/Shi-scidマウスと交配することによりF2マウスを得た。さらにF2マウスでの変異IL-2R γ 鎖遺伝子の導入を上記同様に検出し、かつ血清中の免疫グロブリンを単純免疫拡散法により検出することにより、変異IL-2R γ 鎖遺伝子を有し、かつscid遺伝子がホモであるマウス個体を選別した。その後、上記マウス個体をNOD/Shi-scidマウスに掛け合わせて、得られた産仔のうち変異IL-2R γ 鎖遺伝子を有するものをさらにNOD/S

10 hi-scidマウスと交配した。

以上の戻し交配を少なくとも9回行うことにより、NOG (NOG) マウスを作出した(概略を図11に示す)。ここで、IL-2R γ 鎖遺伝子はX鎖染色体上にあるため、雄マウスにIL-2R γ KOマウスを使用することが有効である。

〔実施例2〕 ヒトT細胞リンパ腫LM-2-JCK移植NOGマウスの作出

15 NOD/Shi-scidマウスおよびNOGマウス(NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO)は、実験動物中央研究所で交配したものをを用いた。BALB/cAJcl-nuマウスおよびC.B-17/Icr-scidマウスは日本クレアより入手した。マウスはすべて5週齢のものをを用い、マウスは無菌条件下で飼育した。

ヒト腫瘍異種移植細胞株であるLM-2-JCKは13歳の男性患者のリンパ腫から確立され、ヌードマウスでの継代異種移植により維持されていた。LM-2-JCKは、ATCC細胞バンク(米国)、JCRB細胞バンク(日本)から入手可能である。LM-2-JCKは、T細胞抗原、CD4およびCD5を発現しているが、免疫グロブリン等のB細胞抗原は発現していない(Maruo et al., APMIS 101: 345-352, 1993)。

20

ヌードマウスで継代移植していたLM-2-JCKをヌードマウス皮下より切り取り、200U/mLのコラゲナーゼ(SIGMA社)および270U/mLのDNase(SIGMA社)を含むF-10栄養補足培地(GIBCO社)中で鋭で細断し分散させ、ナイロンメッシュを通し、均一細胞懸濁液を調製した。懸濁液中の生細胞数は、トリパンブルー(GIBCO BRL社)を用いた染色によりカウントした。遠心分離後腫瘍細胞を生理食塩水を用いて 1×10^7 および 1×10^6 生細胞/mLの細胞密度に調整した。腫瘍細胞懸濁液を25

25

30 ゲージの針を用いてNOGマウス(NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO)、NOD/Shi-scidマウ

ス、BALB/cAJcl-nuマウスおよびC. B-17/Icr-scidマウスの両方の脇腹部分に0.1mL皮下注射した。注射した部位は、8から10箇所であった。腫瘍細胞注入後、1週間に一度腫瘍サイズとマウスの体重を測定した。腫瘍が増殖した後、マウスを犠牲にし腫瘍の大きさを測定した。

- 5 表1に注射部位数と腫瘍が形成された部位数、および腫瘍の重量を示す。

表1 異なる遺伝的バックグラウンドのマウスにおけるLM-2-JCKの異種移植性

マウス系統	移植細胞数	観察期間	腫瘍形成数/注射部位数	腫瘍重量 a)
NOG(NOD/Shi-scid,IL-2R γ KO)	10 ⁶	21日	10/10 (100%)	3.97 \pm 2.10 b)
NOD/Shi-scid	10 ⁶	21日	10/10 (100%)	1.34 \pm 0.77
C.B-17/Icr-scid	10 ⁶	21日	8/10 (80%)	1.21 \pm 1.06
NOG(NOD/Shi-scid,IL-2R γ KO)	10 ⁵	<9週	8/8 (100%) c)	n.t.
NOD/Shi-scid	10 ⁵	<9週	5/10 (50%)	n.t.
C.B-17/Icr-scid	10 ⁵	<9週	0/10 (0%)	n.t.

a) 腫瘍重量は注射21日後に測定した。値は平均 \pm SD(g)で表した。

b) NOD/Shi-scid および C.B-17/Icr-scid と p<0.05で有意に異なる (t 検定)。

c) NOD/Shi-scid (P<0.05) および C.B-17/Icr-scid (P<0.01) と有意に異なる (χ^2 検定)。

n.t. not tested

図1に腫瘍の大きさの経時的変化を示す。図に示すように移植21日後においてNOD/Shi-scidマウスおよびC. B-17/Icr-scidマウスでは腫瘍の大きさはわずかであるが、NOGマウスでは大きく増殖している。

LM-2-JCK細胞はNOGマウスでNOD/Shi-scidマウス、BALB/cAJcl-nuマウスおよびC. B-17/Icr-scidマウスよりも早く増殖し高い生着率を示した。

〔実施例3〕 ヒト多発性骨髄腫U266細胞移植NOGマウスの作出

U266細胞株は、ATCC細胞バンク (米国) より入手した。2 \times 10⁶のU266細胞を250rad放射線を照射したマウス (NOGマウス)、NOD/Shi-scidマウスおよびC. B-17/Icr-scidマウス5匹ずつに静脈注射し移植した。

移植6週間後にNOGマウスで後肢の麻痺、体重減少および立毛、呼吸促迫が認められた。組織学的検査により、腸骨および胸骨への骨髄への過剰な浸潤がNOGマウスで認められたが、NOD/Shi-scidマウスおよびC. B-17/Icr-scidマウスでは

認められなかった。NOGマウスにおいてはU266細胞の脊髄腔への浸潤および腸骨の広範囲な破壊が認められ、これが後肢の麻痺の原因であると推測された。細胞の浸潤は骨髄に限られ、肝臓、脾臓、肺などの他の器官には浸潤は認められなかった。U266細胞を移入したマウスの骨髄においては、FACS解析により80～90%の有核細胞がヒトCD45陽性であった。このことは、ほとんどの骨髄細胞がヒト骨髄腫細胞で置き換わっていることを示している。ヒトIgEもU266細胞を移植したNOGマウス5匹すべての血清中で検出された。このことは、マウス骨髄中のU266細胞はIgE分泌能を保持していることを示し、多発性骨髄腫の病態を反映する。

表2に各マウスにおけるU266細胞の移植性を示す。

表2

免疫不全マウスにおけるヒト骨髄腫細胞株 U266の異種移植性

細胞株	マウス	U266骨髄腫細胞の浸潤					
		骨髄			脾臓	肝臓	肺
		大腿骨	脊椎	胸骨			
U266	NOG(NOD/Shi-scid,IL-2R γ KO)	5/5 *	5/5	5/5	0/5 **	0/5	0/5
	NOD/Shi-scid	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	C.B-17/Icr-scid	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

* 大腿骨の骨髄には明白な骨髄腫細胞の浸潤が認められ、病巣の繊維形成を伴う壊死が顕著である。

** 巨核球が顕著に増大した。この特徴は髄外の造血を示唆する。

表2に示すように、NOGマウスの骨髄でU266細胞の浸潤が認められたが、NOGマウスの脾臓、肝臓および肺ならびにNOD/Shi-scidマウスおよびC.B-17/Icr-scidマウスの骨髄、脾臓、肝臓および肺では浸潤は認められなかった。

図2～5にU266細胞を異種移植したNOGマウスにおけるU266細胞の浸潤部位の写真を示す。図2および3の写真（それぞれ5.3倍および12倍の拡大写真）が示すように、細胞は骨髄の骨髄間隙を占め、骨溶解作用をしめしており、筋肉組織周囲にも侵襲的に増殖していた。また、図4および5の写真（100倍の拡大写

真) が示すように、不定形のプラズマ細胞が骨髄の骨髄間隙を占めていた。

図 6 および 7 は U266 細胞を異種移植した NOD/Shi-scid マウスの骨髄を示す写真であり (それぞれ 12 倍および 100 倍の拡大写真)、写真に示すように骨髄中に U266 細胞の浸潤部位は認められない。

- 5 図 8 および 9 は U266 細胞を異種移植した C. B-17/Icr-scid マウスの骨髄を示す写真であり (それぞれ 12 倍および 100 倍の拡大写真)、写真に示すように骨髄中に U266 細胞の浸潤部位は認められない。

図 10 は、U266 細胞を異種移植した NOG マウスおよび C. B-17/Icr-scid マウスの脾臓を示す写真である。

- 10 図 10 に示すように、脾臓においては NOG マウスでも C. B-17/Icr-scid マウスでも U266 細胞の浸潤は認められない。

また、U266 細胞を移植した NOG マウスの寿命は約 6 週間であった。なお、NOG マウスに放射線照射をすることなく、U266 細胞を移植しても骨髄中に生着することが確認されている。

15

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

- 20 実施例 1 に示したように、NOG マウスに U266 細胞を移植した場合、拒絶されることなく骨髄に生着し、U266 細胞が生着した NOG マウスは、ヒト多発性骨髄腫のモデルとして利用することができ、ヒト多発性骨髄腫の病理の研究や新たな抗がん剤のスクリーニングに用いることができる。

- 25 また、実施例 2 に示したように、NOG マウスにリンパ腫細胞 (LM-2-JCK) を移植した場合、拒絶されることなく生着し、LM-2-JCK が生着した NOG マウスはヒトリンパ腫のモデルとして利用することができ、ヒトリンパ腫の病理の研究や新たな抗がん剤のスクリーニングに用いることができる。

請求の範囲

1. NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) マウスにヒト造血器腫瘍細胞を移植することを含む、ヒト造血器腫瘍マウスモデルの作出法。
- 5 2. ヒト造血器腫瘍細胞がヒト多発性骨髄腫細胞U266細胞である、請求項1記載のヒト造血器腫瘍マウスモデルの作出法。
3. ヒト造血器腫瘍細胞がヒトT細胞リンパ腫細胞LM-2-JCKである、請求項1記載のヒト造血器腫瘍マウスモデルの作出法。
4. ヒト造血器腫瘍細胞が移植され体内にヒト造血腫瘍が形成されたヒト造血器腫瘍NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) マウスモデル。
- 10 5. ヒト造血器腫瘍がヒト多発性骨髄腫である請求項4記載のヒト造血器腫瘍NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) マウスモデル。
6. ヒト造血器腫瘍がヒトT細胞リンパ腫であるヒト造血器腫瘍NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) マウスモデル。
- 15 7. 請求項4記載のヒト造血器腫瘍マウスモデルに被験物質を投与することを含む、ヒト造血器腫瘍の治療薬のスクリーニング方法。
8. ヒト造血器腫瘍がヒト多発性骨髄腫である請求項7記載のスクリーニング方法。
9. ヒト造血器腫瘍がヒトリンパ腫である請求項7記載のスクリーニング方法。
- 20

図1

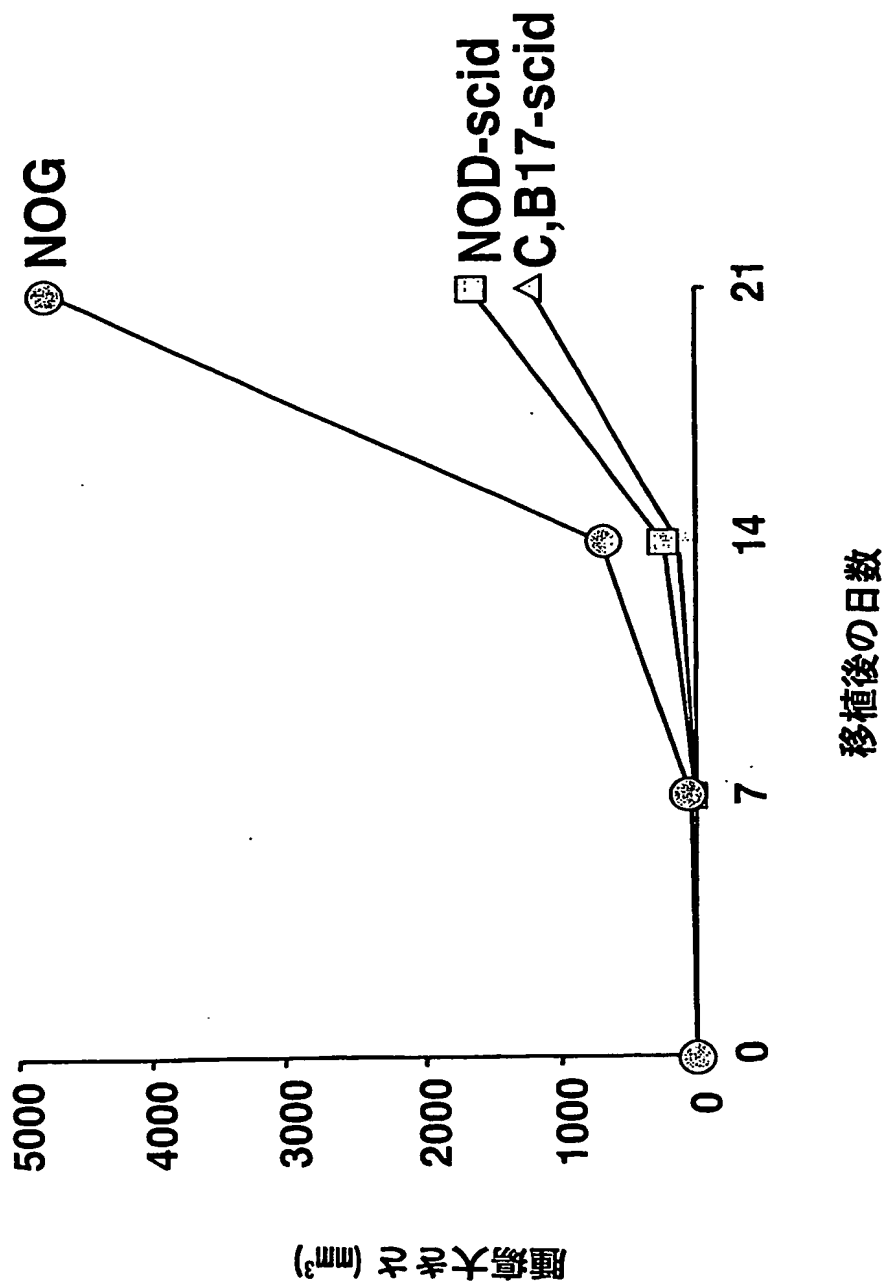


図2



図3



図4

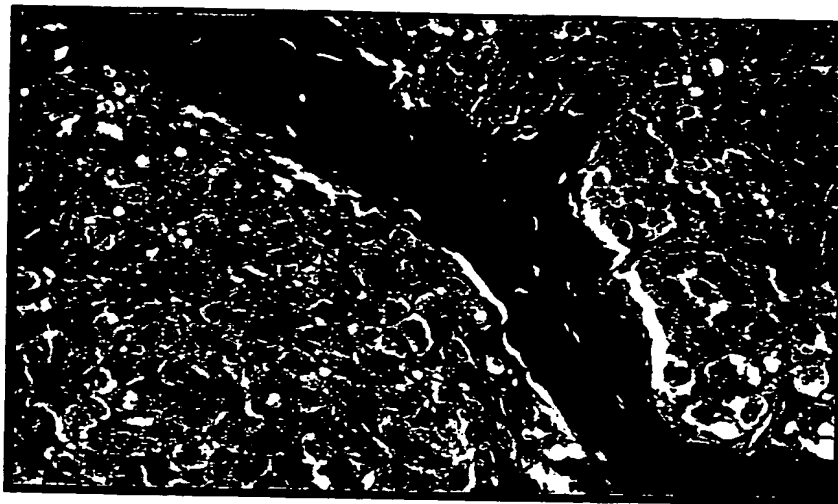


図5

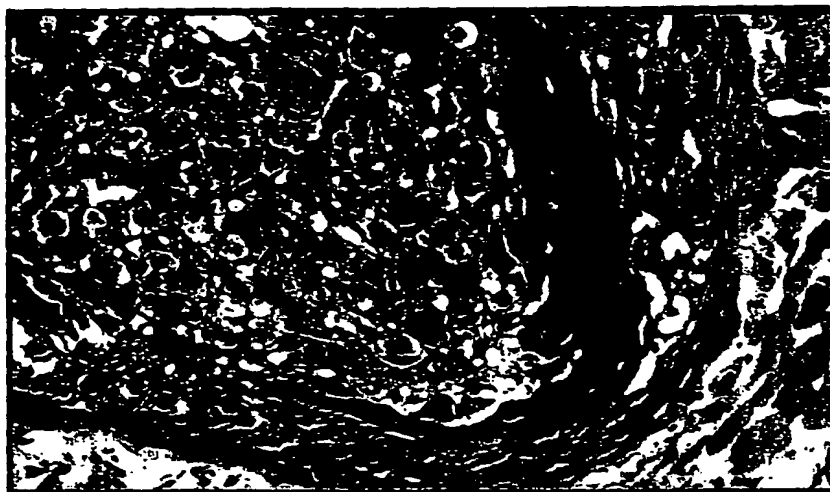


図6



図 7

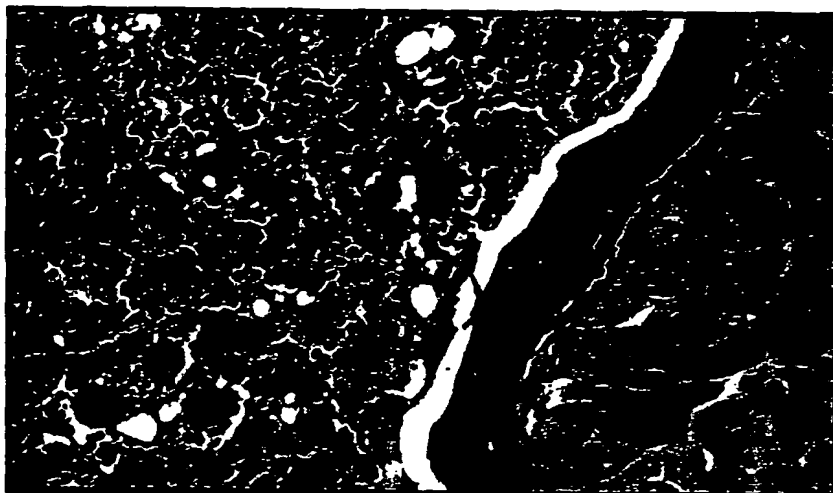


図8



図9

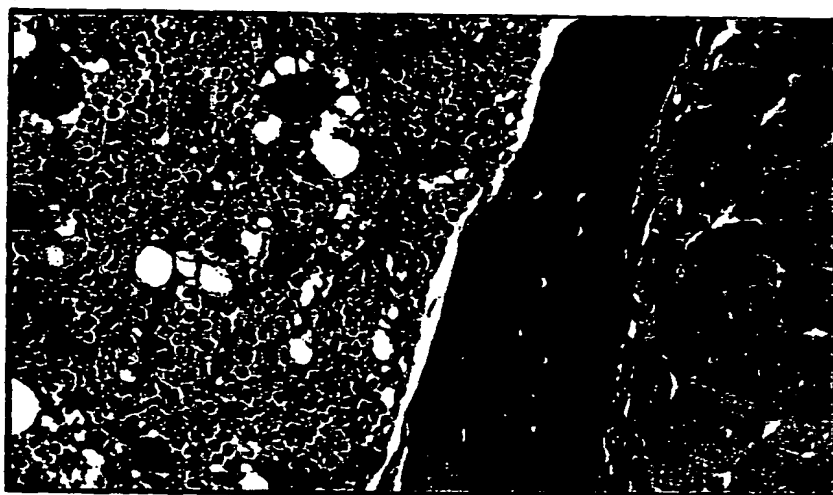


図10

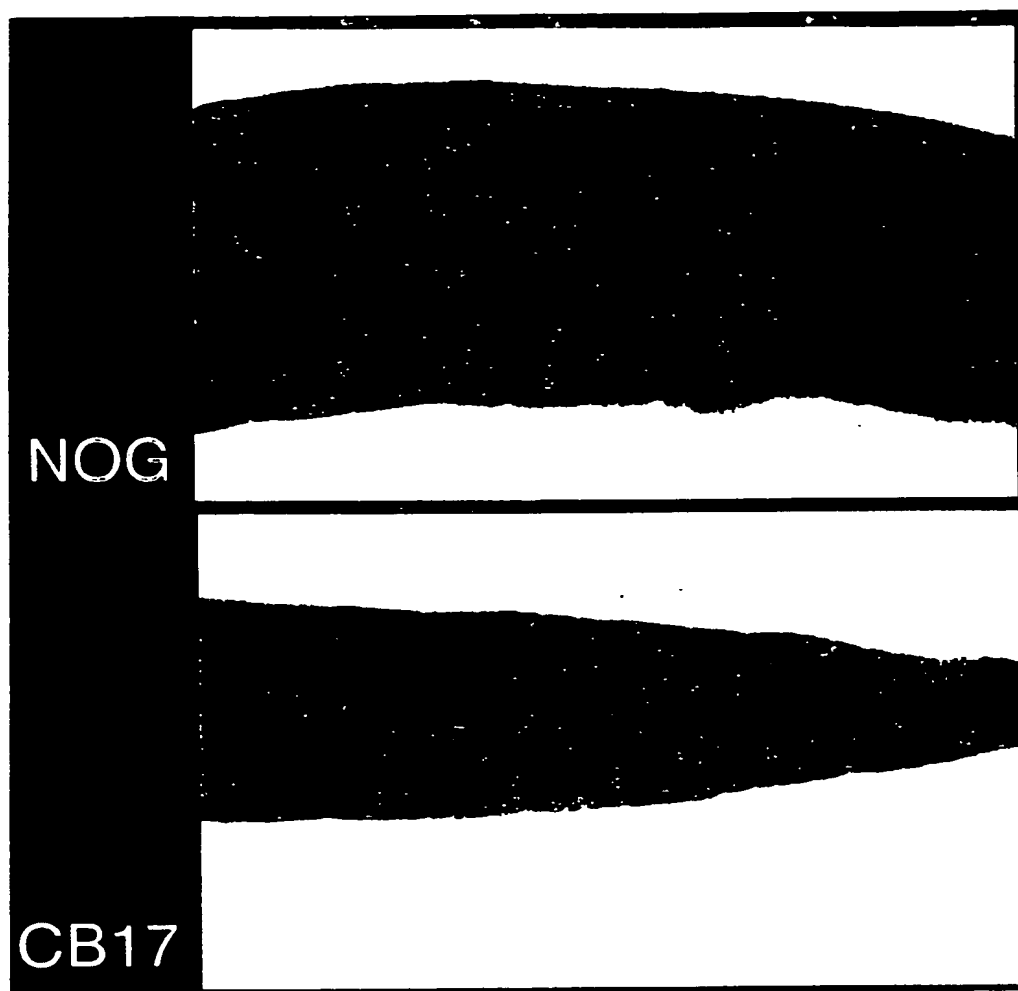
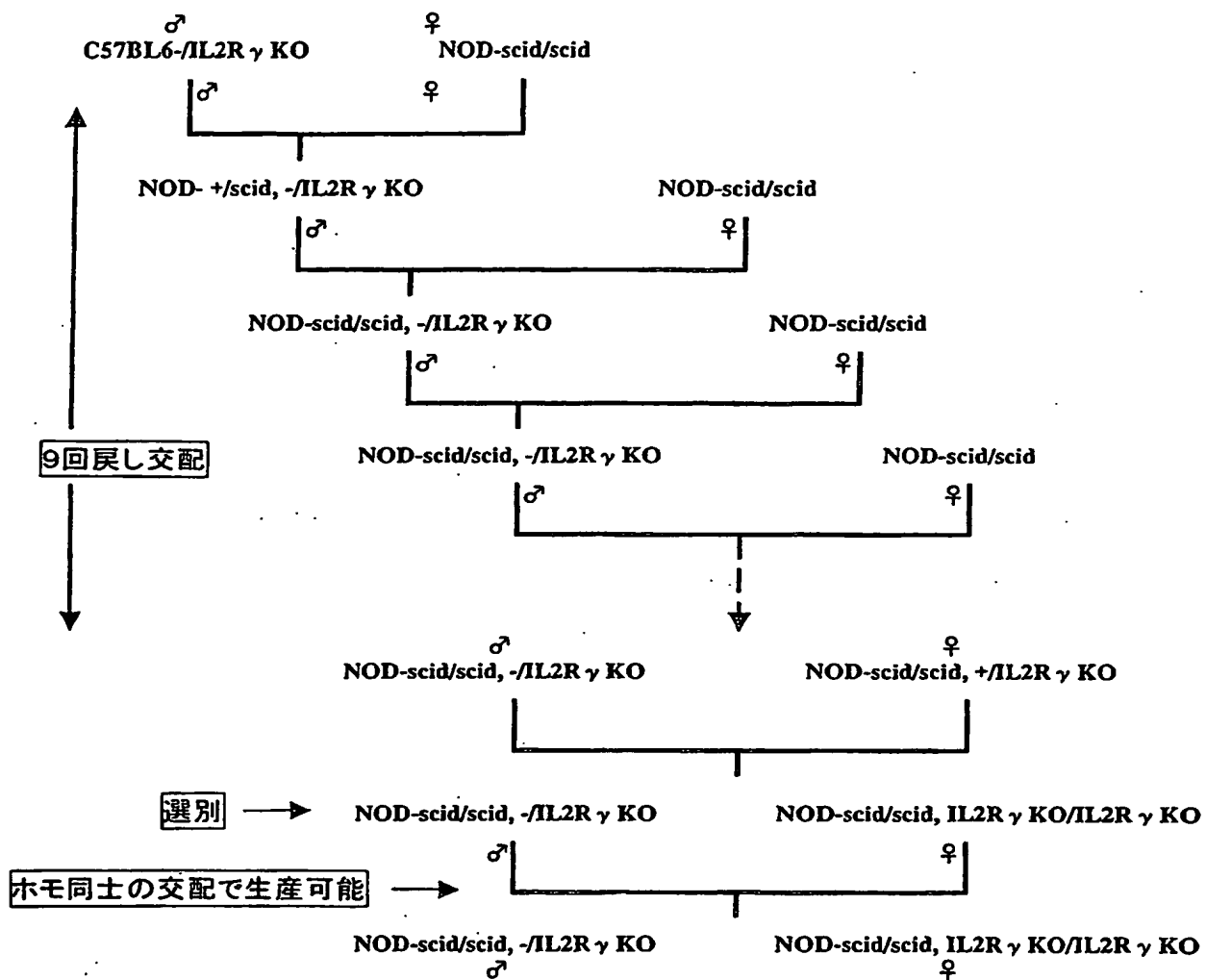


図 11



SEQUENCE LISTING

<110> Central Institute for Experimental Animals.

KEIO UNIVERSITY

<120> An animal experimental model of human hematopoietic tumor

<130> PH-1941-PCT

<150> JP 2002/322995

<151> 2002-11-06

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer PI.

<400> 1

ctgctcagaa tgatgcctcc aattcc 26

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer PII.

<400> 2

ccigcgtgca atccatcttg ttcaat 26

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Primer PIII.

<400> 3

gatccagatt gccaaaggtga gtag 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/14149

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A01K67/027, C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A01K67/027, C12N5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	WO 02/43477 A1. (CENTRAL INSTITUTE FOR EXPERIMENTAL ANIMALS), 06 June, 2002 (06.06.02), Example 5; table 4, Claims 4 to 6, 16, 19 & CA 2402459 A & EP 1338198 A1	<u>1, 3, 4, 6, 7, 9</u> 2, 5, 8
Y	Urashima, M. et al., "The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow", Blood, (1997), Vol.90, No.2, pages 754 to 765	1, 2, 4, 5, 7, 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 15 January, 2004 (15.01.04)	Date of mailing of the international search report 27 January, 2004 (27.01.04)
--	---

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/14149

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Miyakawa, Y. et al., "Establishment of human multiple myeloma model using newly developed immunodeficient NOD/SCID/IL-2Rgamma-/- (NOG) mice", Blood, (16 November, 2002 (16.11.02)), Vol.100, No.11, pp.Abst.No.2366 (abstract), BIOSIS[online]; Biological Abstracts Inc., Retrieved from STN. BIOSIS accession no.2003: 337064	1,2,4,5,7,8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A01K67/027, C12N5/00

B. 調査を行った分野
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁷ A01K67/027, C12N5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 02/43477 A1 (CENTRAL INSTITUTE FOR EXPERIMENTAL ANIMALS), 2002.06.06, 実施例5、表4、請求の範囲4-6, 16, 19参照 & CA 2402459 A & EP 1338198 A1	1, 3, 4, 6, 7, 9 2, 5, 8
Y	Urashima, M. et al., "The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow" Blood, (1997), Vol. 90, No. 2, pp. 754-765	1, 2, 4, 5, 7, 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
15. 01. 2004

国際調査報告の発送日
27. 1. 2004

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
新留 豊
4 B 9 6 3 9
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Miyakawa, Y. et al., "Establishment of human multiple myeloma model using newly developed immunodeficient NOD/SCID/IL-2Rgamma-/- (NOG) mice" Blood, (November 16, 2002) Vol.100, No.11, pp. Abst.No.2366 (abstract) BIOSIS [online]; Biological Abstracts Inc., Retrieved from STN. BIOSIS accession no.2003:337064	1, 2, 4, 5, 7, 8

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.